

AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN MENGGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY

by Asmiyenti Djaliasrin Djalil

Submission date: 23-Nov-2018 05:09AM (UTC+0700)

Submission ID: 1043635812

File name: aktivitas_estrogenik.doc (158K)

Word count: 2591

Character count: 16419

AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN MENGGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY

Estrogenic Activity of Sunflower and Sesame Seeds Determined by Yeast Estrogen Screen Assay Method

Binar Asrining Dhiani, Desi Reza Anomsari, Anna Aulia Kisti, Siti Miftahul. J, Asmiyenti Djaliasrin. D
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto

ABSTRACT

The number of postmenopausal women in the world is expected to increase up to 1.2 billion in 2030. The therapy which is widely used to control the symptoms of menopause are hormone replacement therapy (HRT), however HRT cause some side effects, including breast cancer. The use of phytoestrogens as a substitute for estrogen intake becomes a substitute therapy. Sunflower seeds and sesame seeds are examples of plants that have been consumed to cope with menopausal complaints. These seeds contain isoflavones, lignans and coumestan. This study was conducted to determine the estrogenic activity of sunflower seeds and sesame seeds using YES method with gene deletion PDR5, SNQ2 and YOR1. The assay was carried out using ethanol extract of sunflower seeds and sesame seeds with a series of concentrations from 50 to 2000 µg/ml with genistein as positive control. The units of β-galactosidase defined as Miller units and EC50 values were determined by using non-linear regression analysis with log dose-response parameters. The results showed that genistein and sunflower seeds resulted EC50 values 7,822x10⁻¹⁵ M and 981.2 µg/ml, respectively, whereas the EC50 value of sesame seeds could not be determined. Sunflower seeds exhibited a weak estrogenic activity whereas the estrogenic activity of sesame seeds failed to be determined using YES method.

Keywords: estrogenic activity, YES assay, sunflower seeds, sesame seeds

ABSTRAK

Jumlah wanita pascamenopause di dunia diperkirakan akan bertambah menjadi 1,2 milyar jiwa pada tahun 2030. Terapi yang telah luas digunakan untuk mengatasi keluhan yang terjadi akibat menopause adalah terapi penggantian hormon estrogen (*hormon replacement therapy*, HRT), namun HRT menyebabkan beberapa efek samping termasuk kanker payudara. Hal ini menyebabkan penggunaan fitoestrogen sebagai pengganti asupan estrogen menjadi pilihan. Biji bunga matahari dan biji wijen adalah contoh tanaman yang telah digunakan sebagai fitoestrogen yang dikonsumsi untuk mengatasi keluhan menopause karena mengandung senyawa isoflavan, ligan dan coumestan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas estrogenik biji bunga matahari dan biji wijen dengan menggunakan metode *Yeast Estrogen Assay* (YES) yang telah mengalami penghapusan gen PDR5, SNQ2 dan YOR1. Pengujian dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanol biji bunga matahari dan biji wijen dengan seri konsentrasi dari 50 hingga 2000 µg/ml dengan kontrol positif genistein. Satuan β-galaktosidase ditetapkan sebagai Miller Unit sedangkan nilai EC₅₀ ditentukan menggunakan analisis regresi non linier dengan parameter log dosis-respon. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genistein dan biji bunga matahari menghasilkan nilai EC₅₀ masing-masing sebesar 7,822x10⁻¹⁵ M dan 981,2 µg/ml, sedangkan nilai EC₅₀ biji wijen tidak dapat ditentukan. Biji bunga matahari menunjukkan aktivitas estrogenik yang lemah sedangkan aktivitas estrogenic dari biji wijen tidak dapat ditentukan dengan metode YES. **Kata kunci:** aktivitas estrogenik, YES assay, biji bunga matahari, biji wijen

PENDAHULUAN

Menopause merupakan keadaan hipo-estrogenik akibat penurunan fungsi dari ovarium. Keadaan ini dapat menimbulkan perubahan pada

Alamat korespondensi:

Jalan Raya Dukuwaluh Purwokerto
53182 e-mail: binar_ad@yahoo.com

beberapa sistem dan organ tubuh. Gejala vasomotor, atrofi urogenital, peningkatan risiko osteoporosis dan kelainan kardiovaskuler adalah gejala yang dapat timbul pada wanita menopause (Indra *et al.* 2009). Diperkirakan jumlah wanita pasca menopause di dunia sekitar 476 juta jiwa pada tahun 1990. Setidaknya

μL dipindahkan ke 96-well microplate untuk diukur OD₆₆₀-nya. Kultur sel yang lainnya diambil 100 μL untuk disentrifugasi dengan kecepatan 10,000xg lalu lisat sel dipisahkan dari supernatan. Lisat kemudian diresuspensi dalam Z-buffer 200 μL yang mengandung 0,2 mg/mL Zymolyase 100 T, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 15 menit. Lisat sel yang dihasilkan dari sentrifugasi dan resuspensi dengan Z-buffer kemudian diinkubasi dengan 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ substrat (20 μg oNPG dalam 0,1 M sodium fosfat buffer pH 7,0) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Saat warna kuning oNPG terbentuk, 100 μL Na₂CO₃ 1 M ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Larutan sebanyak 150 μL larutan dipindahkan ke mikroplate dan dibaca absorbansi pada panjang gelombang 420 nm dan 550 nm.

Satuan β -galaktosidase ditetapkan sebagai *Miller Unit* dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Miller Unit} = 1000 [\text{OD}_{420} - 1,75 (\text{OD}_{550})] / [\text{OD}_{660} (\text{T}) (\text{V})] \dots\dots (1)$$

OD₄₂₀ adalah absorbansi warna kuning dari oNP, OD₅₅₀ adalah hamburan dari sel debris, bila dikalikan dengan 1,75 mendekati hamburan sel debris pada OD₄₂₀. OD₆₆₀ merupakan kepadatan sel pada awal uji, T adalah lama inkubasi waktu reaksi (menit), dan V adalah volume kultur yang digunakan pada uji (ml).

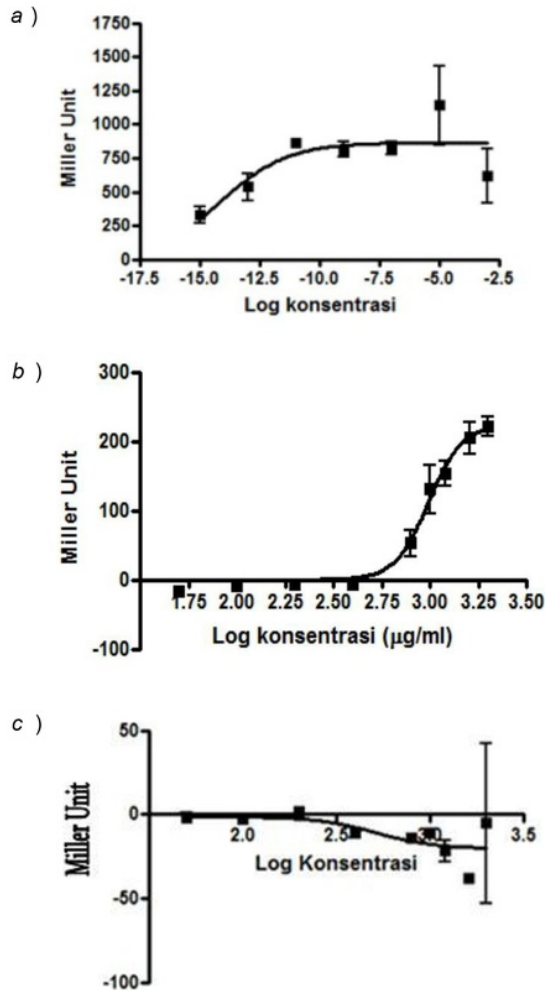
Data satuan β -galaktosidase dan EC₅₀ disesuaikan dengan parameter empat model *logistic dose-response*. Perhitungan EC₅₀ dilakukan dengan menggunakan Program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode *Yeast Estrogen Screen* (YES) secara luas digunakan untuk menentukan aktivitas estrogenik bahan kimia dan senyawa bioaktif termasuk fitoestrogen. Sistem YES yang digunakan dalam penelitian ini telah mengalami penghapusan 3 gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1* yang merupakan *yeast ATP-Binding Cassette (ABC) transporter* sehingga sistem YES yang digunakan lebih sensitif terhadap senyawa fitoestrogen (Jungsukcharoen *et al.*, 2014). *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1* merupakan gen yang bertugas memompa keluar dan masuknya obat dalam *yeast*.

Metode YES berdasarkan pada ekspresi reseptor estrogen yang berikatan dengan senyawa estrogenik pada elemen reseptor estrogen yang dihubungkan dengan gen pengatur *LacZ* pada *yeast*. Ketika senyawa estrogenik terikat pada reseptor estrogen, maka transkripsi gen pengatur *LacZ* akan teraktivasi. Aktivasi transkripsi akan menimbulkan ekspresi enzim β -galaktosidase. Dengan adanya enzim β -galaktosidase akan mengubah oNPG menjadi oNP yang berwarna kuning dan dapat diukur absorbansinya pada OD₄₂₀ nm. Satuan β -galaktosidase yang dihasilkan dari interaksi antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen pada sistem YES ditetapkan sebagai *Miller Unit* (Boonchird *et al.*, 2010).

Genistein pada konsentrasi 10⁻⁵ M menghasilkan satuan β -galaktosidase yang paling tinggi dan satuan β -galaktosidase terendah dihasilkan pada konsentrasi 10⁻¹⁵ M. Ekstrak etanol biji bunga matahari pada konsentrasi uji terendah 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menghasilkan satuan β -galaktosidase sebesar -16,76. Namun, pada konsentrasi 800 hingga 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terjadi peningkatan hingga 221,01 *Miller Unit*. Satuan β -galaktosidase ekstrak etanol biji wijen menghasilkan hasil perhitungan negatif walaupun akhirnya pada konsentrasi tertinggi 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diperoleh *Miller Unit* sebesar 1,89.



Gambar 1. Hubungan antara log konsentrasi a) genistein, b) ekstrak etanol biji bunga matahari, dan c) biji wijen dengan unit β -galaktosidase (*Miller Unit*). Nilai *Miller Unit* didapatkan dari pengujian yang diulang sebanyak tiga kali dan dinyatakan sebagai nilai rata-rata \pm standard error

Satuan β -galaktosidase dan konsentrasi senyawa uji dianalisis dengan menghubungkan variabel tersebut menggunakan kurva log dosis-respon. Nilai *Effective Concentration 50* (EC_{50}) ditentukan menggunakan Program GraphPad Prism versi 4. Nilai EC_{50} merupakan konsentrasi efektif dimana konsentrasi suatu senyawa menghasilkan 50% efek maksimal. Nilai EC_{50} yang rendah menunjukkan bahwa senyawa uji mempunyai aktivitas estrogenik yang tinggi.

Berdasarkan Gambar 1. dapat dilihat bahwa nilai EC_{50} dari kontrol positif genistein adalah $7,82 \times 10^{-15}$ M. Menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Jungsukcharoen *et al.* (2014) nilai EC_{50} genistein adalah $2,8 \times 10^{-6}$ M. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif genistein memiliki aktivitas estrogenik lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini menggunakan sistem YES yang telah mengalami penghapusan gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1* sehingga sistem YES lebih sensitif dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang hanya menghapus gen *SNQ2* saja.

Nilai EC_{50} 19 ekstrak etanol biji bunga matahari yaitu 981,2 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji bunga matahari memiliki aktivitas estrogenik yang rendah bila dibandingkan dengan nilai EC_{50} Genistein sebagai kontrol positif. Nilai EC_{50} dari ekstrak etanol biji wijen tidak dapat ditentukan karena satuan β -galaktosidase yang dihasilkan bernilai negatif. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol wijen tidak memiliki aktivitas estrogenik.

Kandungan fitoestrogen dari biji wijen yang termasuk golongan senyawa lignan yaitu matairesinol, lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol hampir 40 kali lebih besar dari kandungan lignan pada biji bunga matahari (Thompson *et al.*, 2006). Aktivitas estrogenik yang ditunjukkan oleh biji bunga matahari lebih tinggi dari pada biji wijen bila ditentukan dengan metode YES. Hal ini dapat dijelaskan melalui dua hal yaitu pertama, lignan yang terkandung dalam tanaman merupakan prekursor lignan yang dalam tubuh manusia akan diubah menjadi enterolignan, enterodiol dan enterolakton oleh bakteri intestinal (Lampe, 2003). Hasil ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini hanya menyari prekursor lignan tersebut, sehingga tidak dapat menunjukkan aktivitas estrogenik seperti yang terjadi ketika senyawa prekursor lignan tersebut telah dikonsumsi oleh manusia. Kedua, metode YES yang mendasarkan pada ikatan yang terjadi antara senyawa estrogenik dengan reseptor estrogen tidak mampu menunjukkan aktivitas estrogenik dari senyawa lignan yang sebenarnya. Ketidakmampuan ini terjadi karena enterolignan dapat menunjukkan aktivitas estrogenik yang tidak berkaitan dengan ikatannya dengan reseptor estrogen. Mengubah aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme estrogen, lignan dapat mengubah aktivitas biologis dari estrogen endogen (Brooks *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki aktivitas estrogenik yang rendah dengan nilai EC_{50} sebesar 981,2 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol biji wijen (*Sesamum indicum* L.) tidak menunjukkan aktivitas estrogenik bila ditentukan dengan metode YES. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian penentuan aktivitas estrogenik dari enterolignan, enterodiol dan enterolakton dari biji wijen dan menggunakan metode pengujian yang tidak berdasarkan pada respon yang terjadi akibat ikatan antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Badzaid A., 2003, Endokrinologi ginekologi, edisi ke-2. Jakarta : KSERI
- Becker D., Jacob L., Amos P., Dov S., Eyal N., Galit B., Roberto M., 2001, Psychological Distress Around Menopause, *Psychosomatics*, 42: 252-257
- Biben A., 2012, Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi Non Reproduksi Dan Keamanan Penggunaannya, Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami
- Boonchird C., Mahapanichkul T., Cherdshewasart W., 2010, Differential binding with ER α and ER β of the phytoestrogen-rich plant *Pueraria mirifica*, *Braz J Med Biol Res*, 43: 195-200
- Brooks J.D., Thompson L.U., 2005, Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94(5):461-467
- Glover A., Assinder S.J., 2006, Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression, *Jour Endoc*, 189: 565-573
- Indra E.S., Fauzi N., Widyani R., 2009, Skin and Menopause - Manifestation and Treatment, *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*, 21(1): 48-55
- Jungsukcharoen J., Dhiani B.A., Cherdshewasart W., Vinayekhin N., Sangvanich P., Boonchird C., 2014, *Pueraria mirifica* leaves, an alternative potential isoflavonoid source, *Biosci Biotechnol Biochem*, DOI:10.1080/09168451.2014.910091., 78(6): 917-926
- Kurzer M.S., Xu X., 1997, Dietary Phytoestrogens, *Annu Rev Nutr*, 17:353-381
- Lampe J.W., Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers, 2003, *J Nutr*, 133(Suppl 3): 956S-964S
- Manonai J., Chittacharoen A., Udomsubpayakul U., Theppisai H., Theppisai U., 2008, Effects and safety of *Pueraria mirifica* on lipid profiles and

- 6
biochemical markers of bone turnover rates in healthy postmenopausal women, *Menopause*, 15(3): 530-533
- 9
Routledge, E. J., Sumpter, J. P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Env Toxicol Chem*, 15(3): 241-248
- Sastroasmoro, S., Soebijanto, N., Mardiaty, R., 7
Tami, W.N., Nasrul, M., Arcan, M., et al, 2004, Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause, *HTA Indonesia* : 1-39
- 10
Thompson L.U., Boucher B.A., Liu Z., Cotterchio M., Kreiger N., 2006, Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans and Coumestan, *Nutr Cancer*, 54(2) : 184-201
- 11
Umland, E.M., 2008, Treatment Strategies for Reducing the Burden of Menopause-Associated Vasomotor Symptoms, *J Manag Care Pharm*, 14(3 Suppl): 14-9.
- 5
Zhang, C.Z., Wang, S. X., Zhang, Y., Chen, J. P., Liang, X. M., 2005, In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms, *J Ethnopharmacol*, 98(3): 295-300

AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN MENGGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

17%

INTERNET SOURCES

7%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	journal.unair.ac.id Internet Source	3%
2	biologi.fst.unair.ac.id Internet Source	2%
3	Jungsukcharoen, Jutarmas, Binar Asrining Dhiani, Wichai Cherdshewasart, Nawaporn Vinayavekhin, Polkit Sangvanich, and Chuenchit Boonchird. "Pueraria mirifica leaves, an alternative potential isoflavonoid source", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2014. Publication	2%
4	rizqidyan.wordpress.com Internet Source	2%
5	159.226.238.44 Internet Source	1%
6	www.scielo.br Internet Source	1%

7	www.scribd.com Internet Source	1%
8	eprints.uny.ac.id Internet Source	1%
9	tel.archives-ouvertes.fr Internet Source	1%
10	Jianmin Chen. "Effects of Flaxseed Lignan and Oil on Bone Health of Breast-Tumor-Bearing Mice Treated With or Without Tamoxifen", Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 01/2011 Publication	1%
11	www.redalyc.org Internet Source	1%
12	docplayer.info Internet Source	<1%
13	academic.bcnnakhon.ac.th Internet Source	<1%
14	www.ajtmh.org Internet Source	<1%
15	vdocuments.mx Internet Source	<1%
16	www.tempointeraktif.com Internet Source	<1%

17

pingpdf.com

Internet Source

<1%

18

elibrary.unisba.ac.id

Internet Source

<1%

19

eprints.unsri.ac.id

Internet Source

<1%

20

pt.scribd.com

Internet Source

<1%

21

"4. Minimally invasive product market.(GLOBAL MINIMALLY INVASIVE AND NON INVASIVE SURGERY MARKET)", Medical Devices Market Research Report, Sept 1 2009 Issue

Publication

<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On